

2017年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 中島 健介 (理工学研究科松田研究室)

研究課題 ヒドラジン曝露による環境への影響とリスク評価に関するシミュレーション研究

研究期間 2017年4月1日～2018年3月31日

研究成果概要

本年度は、下記に示す3つの研究テーマに従事し、成果を得た。

<研究テーマ 1> ヒドラジン曝露による環境への影響とリスク評価に関するシミュレーション研究

ヒドラジンは、強い還元力・引火性を有し常温保存も可能であることから、ミサイル燃料や航空機燃料など、軍事産業分野・工業分野にも広く利用されている。また、ヒドラジンの一水和物である水加ヒドラジンは、車載用貴金属フリー液体燃料電池のエネルギーキャリアとしての利用が模索されている一方で、不測の事態を想定した自然界へのヒドラジン漏出による環境および人体への影響をシミュレーションしたデータは乏しい。そこで、本研究では、前年度に引き続き、国立環境研究所より公開されている曝露評価シミュレーションツール (MuSEM) および媒体 (大気、水、土壌、底質など) 間における化学物質の移動・分配を考慮した化学物質濃度の分布推定ツール (G-CIEMS) を用いて、関西学院大学が設置されている兵庫県下のヒドラジン曝露によるリスク評価を行った。

まず、化学物質排出移動量届出制度 (PRTR 制度) に基づく最新年度 (2015 年度) の公表値を用いて、兵庫県下におけるヒドラジン曝露による環境および人体へのリスク評価を行った。その結果、MOS (Margin of safety) 値が 100 以下だと危険とされる数値に対して、2015 年度の MOS 値は約 17,000 であった。前年度 (2014 年度) のデータを利用した MOS 値が、約 18,000 であったことを考慮すると、リスクは少し高くなっていることが見て取れたが、現時点でのヒドラジンによる環境・人体への影響は、概ね皆無であると考えられる。

次に、G-CIEMS を利用し、PRTR 制度に基づく兵庫県下の河川水系ならびにその流域におけるヒドラジン濃度の分布推定を実施した。そこで、G-CIEMS によるシミュレーションを実行するために必要となるヒドラジンの物性を調査ならびに計算することにより、シミュレーションを行うのに必要な最小限のデータを取得した。取得したデータと G-CIEMS にすでに登録されているヒドラジンの排出移動量 (2004 年度) を利用し、兵庫県の 1 級河川である円山川水系、加古川水系ならびに揖保川水系流域における河川、土壌および大気におけるヒドラジン濃度分布をシミュレーションした。その結果、河川自体や河川流域の大気中に比べて、河川流域の土壌におけるヒドラジン濃度が平均的に高く、ヒドラジンが土壌に沈着している傾向が高いことがわかった

今後は、G-CIEMS を用いた解析に必要なパラメーターを文献より抽出・精査することにより、さらに詳細なヒドラジン濃度の分布予測が行えるものと期待される。また、化学構造的に安定なヒドラジン前駆体有機化合物などについても、各化合物の物性調査ならびに生物毒性実験を行い、得られたデータを基に各シミュレーションツールを用いることで同様の安全性評価を行

っていくことも可能であるものと思われる。

<研究テーマ 2> 珪藻葉緑体 4 重包膜局在型重炭酸イオン輸送体候補因子の機能同定

海洋性珪藻類は、地球上の一次生産の約 20%を担う一次生産者であるが、 HCO_3^- 獲得機構に関与する葉緑体 4 重包膜上に局在する輸送体は、これまで不明であった。前年度までに、PtSLC4-6 および PtSLC4-7 が葉緑体 4 重包膜の最外膜に局在し、細胞膜局在型 HCO_3^- 輸送体 PtSLC4-2 と PtSLC4-7 の共過剰発現株における光合成活性および無機炭素輸送活性は、野生株ならびに PtSLC4-2 単独過剰発現株よりも上昇することを確認した。さらに、CRISPR/Cas9 による PtSLC4-7 ノックアウト (KO) 候補株の作出を行い、複数の候補株を取得した。本年度は、前年度に得られた PtSLC4-7KO 候補株を用いて、生育速度ならびに酸素電極を用いた酸素発生速度の解析を行った。しかしながら、PtSLC4-7KO 候補株の生育速度ならびに酸素発生速度は、共に野生株と比較して有意な差は認められなかった。これは、PtSLC4-7 をノックアウトしたことにより同様の局在パターンを示す PtSLC4-6 が機能相補した可能性が考えられた。今後は、PtSLC4-7KO 株における PtSLC4-6 の蓄積量解析と他の PtSLC4-7KO 株の生理学的解析も合わせて行っていく必要があると思われる。

<研究テーマ 3> 麹菌のアミラーゼ分泌機構を利用した有用タンパク質の生産化

麹菌は、細胞外に多量のデンプン分解酵素を分泌することが知られており、この分泌経路を利用したタンパク質生産の宿主細胞として注目されている。そこで、本研究は、富士化学株式会社との共同研究により、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* NS4 株を有用タンパク質発現の宿主細胞として用いて、抗菌活性を有するプロタミン、ならびに血液の抗原判定や癌細胞の早期発見に寄与することが期待されるレクチンの高生産株の取得を目指した。まず、麹菌の細胞外分泌酵素である α -アミラーゼの全長配列および α -アミラーゼの細胞外分泌シグナル配列の直下に、麹菌のコドンに最適化したプロタミンあるいはレクチン遺伝子を連結させ、高発現プロモーターである *PenoA142* で駆動するように設計したコンストラクトを作製した。その後、NS4 株を形質転換し、得られた各形質転換体を培養後、培養上清に含まれる融合目的タンパク質の蓄積量を SDS-PAGE ならびに抗 His-tag 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。しかしながら、各融合タンパク質は、培養上清に検出できなかった。一方で、 α -アミラーゼ全長とプロタミンの融合タンパク質は、細胞内に高蓄積していることがわかった。これは、極端な正電荷を有するプロタミンを付加したことにより、融合タンパク質の細胞外分泌が妨げられたものと思われる。今後は、培養条件の検討や宿主細胞の改変により、各有用タンパク質の細胞外分泌を誘導する必要があると思われる。

<論文発表>

Tsuji Y, Nakajima K, Matsuda Y (2017) Molecular aspects of biophysical CO₂ concentrating mechanism and its regulation in marine diatoms. *J Exp Bot* 68: 3763-3772

<学会発表>

中島健介、辻敬典、松田祐介

海洋性珪藻におけるゲノム編集技術ツールの現状と利用
第4回分子珪藻研究会、2017年12月23日(大阪) 口頭発表

中島健介、岩山和史、大橋弘章、松田祐介

海洋性珪藻における細胞膜重炭酸イオン輸送体
第81回日本植物学会、2017年9月8日~10日(千葉) 口頭発表

Nakajima K, Iwayama K, Ohashi H, Dupont CL, Matsuda Y

“An efficient HCO₃⁻ transport system through plasma and plastidic membranes in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*.”

International conference Molecular life of diatoms, July 9 - July 13, 2017, Kobe, Japan. (Poster).